

PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 22 September 1999 (22.09.99)	Applicant's or agent's file reference B-478AYOP843
International application No. PCT/JP99/01084	Priority date (day/month/year) 06 March 1998 (06.03.98)
International filing date (day/month/year) 05 March 1999 (05.03.99)	
Applicant WACHI, Masaaki et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

27 August 1999 (27.08.99)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

BEST AVAILABLE COPY

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Sean Taylor Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

REC'D 01 MAY 2000

WIPO

PCT

P C T


国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 B-478AYOP843	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/01084	国際出願日 (日.月.年) 05.03.99	優先日 (日.月.年) 06.03.98
国際特許分類 (IPC) Int.Cl ⁷ C12P13/14, C12N15/31 // (C12N15/31, C12R1:13)		
出願人 (氏名又は名称) 味の素株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で _____ ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 27.08.99	国際予備審査報告を作成した日 14.04.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 新見 浩一 	4 N 9162
電話番号 03-3581-1101 内線 3488		

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☒ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1 - 9	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲	1 - 9	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1 - 9	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲 1 - 9 に記載された発明は国際調査報告に表示された文献及び当該発明に関連があると認められる文献に記載されておらず、かつ、それらの文献の記載を組み合わせるにより当業者にとって容易に発明できたものでもない。

EP



PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 B-478AY0P843	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/01084	国際出願日 (日.月.年) 05.03.99	優先日 (日.月.年) 06.03.98
出願人(氏名又は名称) 味の素株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☒ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 1 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁸ C12P 13/14, C12N 15/31 // (C12N 15/31, C12R 1:13)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁸ C12P 13/14, C12N 15/31

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
DDBJ/EMBL/GenBank

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Mol. Gen. Genet., Vol. 191, (1983), Nakamura et al., 「On the process of cellular division in E. coli」 P. 1-9	1-9
A	Mol. Microbiol., Vol. 3, (1989), Laible et al., 「Nucleotide sequence of the pbpX genes encoding the penicillin-binding proteins 2x from Streptococcus pneumoniae R6 and a cefotaxime-resistant mutant, c506.」 P. 1337-1348	1-9

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.05.99

国際調査報告の発送日

18.05.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

4 N

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3488





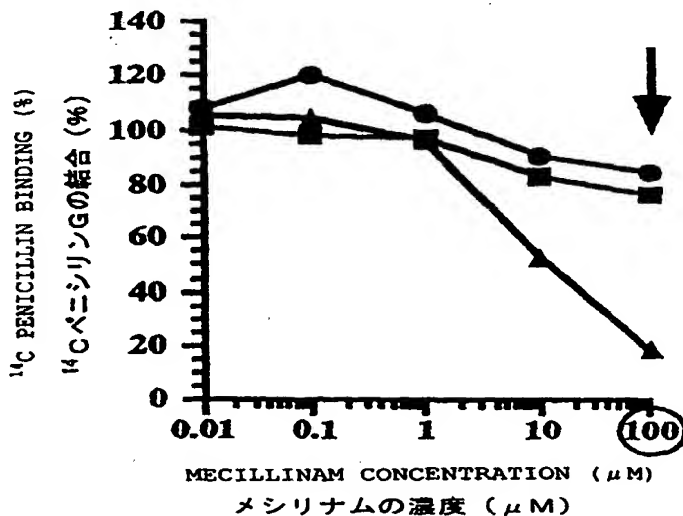
(51) 国際特許分類6 C12P 13/14, C12N 15/31 // (C12N 15/31, C12R 1:13)	A1	(11) 国際公開番号 WO99/45131 (43) 国際公開日 1999年9月10日(10.09.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/01084 (22) 国際出願日 1999年3月5日(05.03.99) (30) 優先権データ 特願平10/55608 1998年3月6日(06.03.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.)(JP/JP) 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 和地正明(WACHI, Masaaki)(JP/JP) 〒194-0002 東京都町田市南つくし野1-4-1-13-202 Tokyo, (JP) 永井和夫(NAGAI, Kazuo)(JP/JP) 〒171-0014 東京都豊島区池袋3-42-17 Tokyo, (JP) (74) 代理人 弁理士 遠山 勉, 外(TOYAMA, Tsutomu et al.) 〒103-0004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 BR, CN, ID, JP, US, VN, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title: **PENICILLIN BINDING PROTEIN GENE AND PROCESS FOR PRODUCING L-GLUTAMIC ACID**

(54) 発明の名称 ペニシリン結合蛋白遺伝子及びL-グルタミン酸の製造法

(57) Abstract

A process for producing L-glutamic acid which comprises the step of culturing a coryneform bacterium in which a penicillin binding protein gene (PBP gene) encoding penicillin binding protein on chromosomes has been disrupted and the normal PBP gene is carried on a plasmid having a temperature-sensitive replication regulatory region, at such a temperature as not allowing the temperature-sensitive replication regulatory region to exert its function, and the step of culturing the bacterium at such a temperature as allowing the temperature-sensitive replication regulatory region to exert its function, thus producing L-glutamic acid.



BEST AVAILABLE COPY

BEST AVAILABLE COPY

染色体上のペニシリン結合蛋白をコードする遺伝子（PBP遺伝子）が破壊され、温度感受性複製制御領域を持つプラスミド上に正常なPBP遺伝子を保持するコリネ型細菌を、同温度感受性複製制御領域が機能しない温度で培養して増殖させる工程と、前記温度感受性複製制御領域が機能する温度で培養してL-グルタミン酸を産生させる工程により、L-グルタミン酸を製造する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	SD スーダン
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SE スウェーデン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SK スロヴァキア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SL シエラ・レオネ
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SN セネガル
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スワジランド
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	TD チャード
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴ
BG ブルガリア	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BJ ベナン	GN ギニア	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BR ブラジル	GW ギニア・ビサウ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM トルクメニスタン
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	共和国	TR トルコ
CA カナダ	HR クロアチア	ML マリ	TT トリニダード・トバゴ
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UA ウクライナ
CG コンゴ	ID インドネシア	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CH スイス	IE アイルランド	MW マラウイ	US 米国
CI コートジボアール	IL イスラエル	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CM カメルーン	IN インド	NE ニジェール	VN ヴェトナム
CN 中国	IS アイスランド	NL オランダ	YU ユーゴスラビア
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NO ノールウェー	ZA 南アフリカ共和国
CU キューバ	JP 日本	NZ ニュー・ジーランド	ZW ジンバブエ
CY キプロス	KE ケニア	PL ポーランド	
CZ チェッコ	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
DK デンマーク	KR 韓国	RU ロシア	

明細書

ペニシリン結合蛋白遺伝子及びL-グルタミン酸の製造法

技術分野

本発明は、発酵法によるL-グルタミン酸の製造方法に関する。L-グルタミン酸は調味料原料等として広く用いられている。

背景技術

コリネ型細菌をビオチン量を制限した培地で培養すると同細菌は著量のL-グルタミン酸を生産する。一方、コリネ型細菌をビオチンが過剰量存在する培地中で培養すると同細菌はL-グルタミン酸を生産しないが、この培養条件でも培地に界面活性剤またはペニシリン等のビオチン作用抑制物質を添加すると、同細菌の生育は抑制され、同細菌は著量のL-グルタミン酸を生成するようになることが知られている。

ペニシリンを培地に添加した際のグルタミン酸生成に関する研究は古くからなされている (T. D. Nunheimer, J. Birnbaum, E. D. Ihnen and A. L. Demasin, Appl. Microbiol., 20, 215-217 (1970))。ペニシリンの効果は細胞表層の構造変化を引き起こし、グルタミン酸の細胞質膜の透過性を向上させることだと考えられてきた。

一方、ビオチンの制限または界面活性剤もしくはペニシリンの添加が、どのような作用機作を通じてコリネ型細菌のL-グルタミン酸の生産性に影響するかについて研究が行われ、L-グルタミン酸生産に関与すると思われる遺伝子の存在が突き止められている (dtsR 遺伝子)。そして、この dtsR 遺伝子が破壊された株は、野生株がほとんどL-グルタミン酸を生成しない量のビオチンが存在する条件においても著量のL-グルタミン酸を生成することが確認されている (W095/23224号国際公開パンフレット)。

さらに、細胞質膜の透過性の向上によりグルタミン酸生成を説明できない知見が多く得られており、ペニシリンによるグルタミン酸生成機構は未だ不明であっ

た（木村英一郎、河原義雄、中松 亘、蛋白質核酸酵素、第42巻、第2633～2640頁(1997)）。

ところで、ペニシリン結合蛋白（P B P : penicillin binding protein）が細菌の細胞分裂に重要な役割を果たすことは良く知られている。ペニシリン結合蛋白は細菌の細胞表層に存在する酵素類であると考えられており、ペニシリン等の β -ラクタム抗生物質と特異的に結合する。細菌の種によって異なるが、大腸菌においては、通常3～8種類検出され、分子量は40,000～120,000前後に分布すると考えられている。ペニシリンは、ペニシリン結合蛋白の活性部位のセリン残基に結合して酵素反応を阻害する。

特に中心的に研究が行われたエシェリヒア・コリ（*E. coli*）では、7つのペニシリン結合蛋白が存在することが分かっており（B. G. Spratt, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 72, 2999(1975)）、その中でP B P 2およびP B P 3と命名されたものが細胞分裂に重要な働きをしていることが示された（B. G. Spratt, J. Bacteriol., 131, 293 (1977)）。しかしながら、コリネ型細菌にペニシリン結合蛋白が存在するかについては知られていなかった。

発明の開示

本発明者は、コリネ型細菌にもペニシリン結合蛋白（以下、「P B P」と略す）が存在するかを調べ、その機能を解析した。その結果、コリネ型細菌のペニシリンによるグルタミン酸生成機構解明への新知見を得ると同時に、コリネ型細菌のグルタミン酸生産能の向上に対し、従来知られていなかった観点からの開発に応用できることを見い出した。

本発明は、上記知見を基になされたものであり、P B Pが正常に機能しておらず、かつ、L-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌を液体培地に培養し、培養液中にL-グルタミン酸を生成蓄積させ、これを採取することを特徴とするL-グルタミン酸の製造法に関する。

本発明の好ましい態様は、前記方法において、コリネ型細菌が、第1の温度ではP B Pが正常に機能し、第2の温度ではP B Pが正常に機能しない細菌であり、該細菌を、第1の温度で培養して増殖させる工程と、第2の温度で培養してL-

グルタミン酸を産生させる工程とを含む方法である。

また、本発明の他の態様は、前記方法において、コリネ型細菌が、PBPをコードする遺伝子（PBP遺伝子）と温度感受性複製制御領域とを含むプラスミドを保持し、かつ染色体上のPBP遺伝子が機能しない細菌であり、第1の温度では前記プラスミドが複製可能であり、第2の温度では前記プラスミドが複製不能である方法である。

さらに、本発明の別の態様は、前記方法において、コリネ型細菌が産生するPBPが温度感受性変異を有する方法である。

また本発明のさらに別の態様は、前記方法において、PBPが、ペニシリンGを結合させたときにSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量約60,000を示す蛋白質である方法である。

本願の第二の発明は、下記（A）又は（B）に示す蛋白質をコードするDNAである。

（A）配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質。

（B）配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ペニシリンに結合する活性を有する蛋白質。

上記発明の好ましい態様は、下記（a）又は（b）に示すDNAである。

（a）配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号881～2623からなる塩基配列を含むDNA。

（b）配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号881～2623からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ペニシリンに結合する活性を有する蛋白質をコードするDNA。

以下、本発明を詳細に説明する。

<1>コリネ型細菌のPBP

本発明において、コリネ型細菌とは、従来ブレヴィバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属に統合された細菌を含み（Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981)）、またコリネバクテリウム属と非常に近縁なブレヴィバ

クテリウム属細菌を含む。このようなコリネ型細菌の例として以下のものが挙げられる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム

コリネバクテリウム・カルナエ

コリネバクテリウム・グルタミカム

コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

コリネバクテリウム・メラセコーラ

ブレビバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

ブレビバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

ブレビバクテリウム・インマリオフィラム

ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

ブレビバクテリウム・ロゼウム

ブレビバクテリウム・サッカロリティカム

ブレビバクテリウム・チオゲニタリス

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス

具体的には、下記のような菌株を例示することができる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム ATCC 13870

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC 15806

コリネバクテリウム・カルナエ ATCC 15991

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13020

コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC 15990

コリネバクテリウム・メラセコーラ ATCC 17965

ブレビバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC 14020

ブレビバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム) AT

CC14067

ブレビバクテリウム・インマリオフィラム ATCC14068

ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC13869

ブレビバクテリウム・ロゼウム ATCC13825

ブレビバクテリウム・サッカロリティカム ATCC14066

ブレビバクテリウム・チオゲニタリス ATCC19240

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス AJ12340 (FERM BP-1539)

本発明にいうPBPは、上記のようなコリネ型細菌の細胞表層に存在する膜蛋白質であり、ペニシリンと接触すると共有結合により結合する。PBPは、例えば、コリネ型細菌の膜画分に標識化したペニシリンを加えて反応させ、界面活性剤可溶性画分をポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、標識を可視化することによって検出することができる(ペニシリン結合試験)。ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムのPBPは、後記実施例に示すように、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により、ペニシリンGが結合した状態で分子量約110kDa、100kDa、および60kDaの3つのバンドとして検出され、それぞれをPBP1、PBP2、およびPBP3と命名された。

これらのPBPと、ペニシリンGの誘導体であるメシリナム(mecillinum)との親和性を調べた結果、メシリナムはPBP3と選択的に結合することが明らかとなった。また、ビオチンが十分量存在する条件下でブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムを培養したところ、メシリナムを一定濃度で存在させるとL-グルタミン酸が生成することが判明した。これらのことから、PBP、少なくともPBP3の機能を阻害することにより、十分量のビオチン存在下でL-グルタミン酸の生成が引き起こされることが示された。したがって、PBPが正常に機能しないコリネ型細菌は、ビオチンが十分量存在していても、ビオチン作用抑制物質を添加することなくL-グルタミン酸生成を引き起こすことが可能となる。また、PBPが正常に機能しないコリネ型細菌は、L-グルタミン酸生産能が向

上する可能性もある。さらに、PBP遺伝子を操作することにより、コリネ型L-グルタミン酸生産に関する新たな知見が得られ、従来知られていなかった観点からの開発に応用することができる。

本発明において、「PBPが正常に機能しない」とは、上記のように十分量のビオチン存在下でL-グルタミン酸の生成が引き起こされる状態をいい、PBP遺伝子の転写又は翻訳が妨げられPBPが産生されない状態であってもよいし、産生されるPBPに変異が起こり、PBPの機能が低下又は消失した状態であってもよい。

< 2 > PBPが正常に機能しないコリネ型細菌

本発明のL-グルタミン酸の製造法に用いるコリネ型細菌は、PBPが正常に機能しないコリネ型細菌であり、その好ましい態様は、第1の培養条件ではPBPが正常に機能し、第2の培養条件ではPBPが正常に機能しない細菌である。このようなコリネ型細菌は、第1の培養条件では増殖することができ、第2の培養条件では十分量のビオチン存在下でL-グルタミン酸を産生することができる。PBPとしては、PBP3が好ましい。

前記培養条件としては、培養の温度、培地の浸透圧、pH及び培地成分等が挙げられる。培地成分としては、IPTG（イソプロピルβ-D-チオガラクトピラノシド）、酢酸のような誘導物質、グルコースのような抑制物質が挙げられる。以下の記載において、培養条件として培養温度を例に説明するが、他の培養条件の場合には、以下の説明中の「温度」をその条件に置き換えればよい。

PBPが正常に機能しないコリネ型細菌としては、例えば、正常に機能するPBPが発現しないようにPBPをコードする遺伝子（PBP遺伝子）に変異が生じた変異株が挙げられる。前記変異は、PBP遺伝子の転写又は翻訳を妨げる変異であってもよいし、正常に機能しないPBPを産生するような変異であってもよい。

PBPを完全に欠損する変異は致死的となるため、前記変異株は、温度感受性変異等の条件変異株として取得され得る。このような変異株は、例えば、コリネ型細菌を紫外線照射または化学薬剤による処理を行い、第1の温度（例えば低温）

では増殖することができ、第2の温度（例えば高温）では増殖しない温度感受性変異株を取得し、得られた変異株の中から、第1の温度で増殖でき、かつ、第2の温度で培養したときに十分量のビオチン存在下でL-グルタミン酸を生成する変異株を選択することによって得られる。尚、このような性質を示す変異株としては、DTSR蛋白欠損株（WO 95/23224号国際公開パンフレット）及び α -KGDH欠損株（WO 95/34672号国際公開パンフレット）も選択され得るが、候補株がPBPに関する変異株であることの確認は、第2の温度で培養した菌体について前記のペニシリン結合試験を行うことによって行うことができる。

上記のような変異株が得られれば、これを宿主として用いることにより、コリネ型細菌のPBP遺伝子をクローニングすることができる。すなわち、PBPが正常に機能しない変異株を、コリネ型細菌由来の染色体DNAを含むプラスミドで形質転換し、PBPが正常に機能する形質転換株を選択し、プラスミドを回収することにより、PBP遺伝子を含むDNA断片を得ることができる。

DNAの切断及び連結、形質転換、形質転換株からの組換えDNAの抽出、及びコロニーハイブリダイゼーション等の一般的な遺伝子組換えに用いられる技術は、当業者によく知られた書籍、例えばモレキュラー・クローニング（Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)）等に詳述されている。

染色体DNAライブラリーは、以下のようにして作製することができる。まず、コリネ型細菌から斎藤、三浦の方法（H. Saito and K. Miura Biochem. Biophys. Acta 72, 619, (1963)）等により染色体DNAを調製する。該染色体DNAを適当な制限酵素で部分分解して種々の断片混合物を得る。切断反応時間等を調節して切断の程度を調節すれば、幅広い種類の制限酵素が使用できる。例えば、Sau3AIを、温度30℃以上、好ましくは37℃、酵素濃度1～10ユニット/mlで様々な時間（1分～2時間）染色体DNAに作用させてこれを消化する。

ついで、切断された染色体DNA断片を、エシェリヒア・コリ細胞内で自律複製可能なベクターDNAに連結し、組換えDNAを作製する。具体的には、染色体DNAの切断に用いた制限酵素 Sau3AI と同一末端塩基配列を生じさせる制限酵素、

例えば B a m H I を、温度 30℃ 以上、酵素濃度 1～100 ユニット/ml の条件下で 1 時間以上、好ましくは 1～3 時間、ベクター DNA に作用させてこれを完全消化し、切断開裂する。次いで、上記のようにして得た染色体 DNA 断片混合物と開裂切断されたベクター DNA を混合し、これに DNA リガーゼ、好ましくは T4 DNA リガーゼを、温度 4～16℃、酵素濃度 1～100 ユニット/ml の条件下で 1 時間以上、好ましくは 6～24 時間作用させて組換え DNA を得る。

エシェリヒア・コリ細胞内において自律複製可能なベクターとしては、プラスミドベクターが好ましく、宿主の細胞内で自立複製可能なものが好ましく、例えば pUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG399、pHSG398、RSF1010 等が挙げられる。

また、これらのベクターにコリネ型細菌中でプラスミドを自律複製可能にする能力をもつ DNA 断片（例えば、pAM 330（特開昭58-67699号公報参照）、pHM 1519（特開昭58-77895号公報参照）、pCG 1（特開昭57-134500号公報参照）、pCG 2（特開昭58-35197号公報参照）、pCG 4（特開昭57-183799号公報参照）、pCG 11（特開昭57-183799号公報参照）等から調製できる）を挿入すると、エシェリヒア・コリ及びコリネ型細菌の両方で自律複製可能ないわゆるシャトルベクターとして使用することができる。

このようなシャトルベクターとしては、以下のものが挙げられる。尚、それぞれのベクターを保持する微生物及び国際寄託機関の寄託番号をカッコ内に示した。

- pAJ655 エシェリヒア・コリ AJ11882 (FERM BP-136)
 コリネバクテリウム・ゲルタミクス SR8201 (ATCC39135)
- pAJ1844 エシェリヒア・コリ AJ11883 (FERM BP-137)
 コリネバクテリウム・ゲルタミクス SR8202 (ATCC39136)
- pAJ611 エシェリヒア・コリ AJ11884 (FERM BP-138)
- pAJ3148 コリネバクテリウム・ゲルタミクス SR8203 (ATCC39137)
- pAJ440 バチルス・スブチリス AJ11901 (FERM BP-140)

得られた組換え DNA を用いて、例えばエシェリヒア・コリ K-12 株を形質転換して染色体 DNA ライブラリーを作製する。この形質転換は D. M. Morrison の方法 (Methods in Enzymology, 68, 326, 1979) あるいは受容菌細胞を塩化カルシ

ウムで処理してDNAの透過性を増す方法 (Mandel, M. and Higa, A., J. Mol., Bio l., 53, 159 (1970)) 等により行うことができる。

次に、得られた染色体DNAライブラリーを用いて、PBPが正常に機能しないコリネ型細菌変異株を形質転換する。コリネ型細菌の形質転換法としては、上記の細胞を塩化カルシウムで処理する方法、または細胞がDNAを取込可能な特定の成長時期に取り込む方法 (Duncan, C. H. et al. によるバチルス・ズブチリスに関する報告) がある。さらに、プラスミドDNAを容易に取り込むDNA受容体のプロトプラストまたはスフェロプラストを成形することによって細菌細胞内に取り込むことが可能である。これらは、バチルス・ズブチリス、アクチノマイセス及び酵母について知られている (Chang, S. et al. Molec. Gen. Genet., 168, 111, (1979)、Bibb et al., Nature, 274, 398, (1978)、Hinnen, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978))。その他、特開平2-207791号公報にコリネ型細菌の形質転換法が開示されている。

形質転換した変異株を、形質転換してない変異株 (宿主) が増殖できない条件で平板培養し、コロニーを形成する株を選択すれば、PBP遺伝子が導入された形質転換株を得ることができる。得られた形質転換株から、例えば P. Guerry らの方法 (J. Bacteriol., 116, 1064, (1973))、D. B. Clewell の方法 (J. Bacteriol., 110, 667, (1972)) などにより組換えDNAを単離することにより、PBP遺伝子を含有するDNA断片を得ることができる。また、公知の微生物のPBP、例えばエシェリヒア・コリのPBPをコードする遺伝子、又はその塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドを用いたハイブリダイゼーションによっても、PBP遺伝子を含む組換えDNAで形質転換されたコリネ型細菌を取得できる可能性もある。

PBPが正常に機能しないコリネ型細菌は、変異処理の他に、上記のようにして得られるPBP遺伝子を利用することによっても創製することができる。PBP遺伝子の内部を欠失し、正常に機能するPBPを産生しないように改変したPBP遺伝子 (欠失型PBP遺伝子) を含むDNAでコリネ型細菌を形質転換し、欠失型PBP遺伝子と染色体上のPBP遺伝子との間で組換えを起こさせることにより、染色体上のPBP遺伝子を破壊することができる。このような相同組換

えによる遺伝子破壊は既に確立しており、直鎖DNAを用いる方法や温度感受性複製制御領域を含むプラスミドを用いる方法などがあるが、本発明においては温度感受性複製制御領域を含むプラスミドを用いる方法が好ましい。

欠失型PBP遺伝子を、宿主染色体上のPBP遺伝子と置換するには以下のようになればよい。すなわち、温度感受性複製制御領域と変異型PBP遺伝子とクロラムフェニコール等の薬剤に耐性を示すマーカー遺伝子とを挿入して組換えDNAを調製し、この組換えDNAでコリネ型細菌を形質転換し、温度感受性複製制御領域が機能しない温度で形質転換株を培養し、続いてこれを薬剤を含む培地で培養することにより、組換えDNAが染色体DNAに組み込まれた形質転換株が得られる。

こうして染色体に組換えDNAが組み込まれた株は、染色体上にもともと存在するPBP遺伝子配列との組換えを起こし、染色体PBP遺伝子と欠失型PBP遺伝子との融合遺伝子2個が組換えDNAの他の部分（ベクター部分、温度感受性複製制御領域及び薬剤耐性マーカー）を挟んだ状態で染色体に挿入されている。したがって、この状態では正常なPBP遺伝子が優性であるので、形質転換株はPBPを発現し、増殖することができる。

次に、染色体DNA上に欠失型PBP遺伝子のみを残すために、2個のPBP遺伝子の組換えにより1コピーのPBP遺伝子を、ベクター部分（温度感受性複製制御領域及び薬剤耐性マーカーを含む）とともに染色体DNAから脱落させる。その際、正常なPBP遺伝子が染色体DNA上に残され、欠失型PBP遺伝子が切り出される場合と、反対に欠失型PBP遺伝子が染色体DNA上に残され、正常なPBP遺伝子が切り出される場合がある。いずれの場合も、温度感受性複製制御領域が機能する温度で培養すれば、切り出されたDNAはプラスミド状で細胞内に保持される。次に、温度感受性複製制御領域が機能しない温度で培養すると、欠失型PBP遺伝子が染色体DNA上に残された場合は、正常なPBP遺伝子を含むプラスミドが細胞から脱落するため増殖できないが、正常なPBP遺伝子が染色体DNA上に残された場合は増殖できる。したがって、温度感受性複製制御領域が機能する温度で増殖することができ、温度感受性複製制御領域が機能しない温度で増殖できない株を選択することによって、染色体DNA上のPBP

遺伝子が破壊され、正常なPBP遺伝子をプラスミド上に保持する株を得ることができる。

上記のようにして得られるPBP遺伝子破壊株は、温度感受性複製制御領域が機能する温度（例えば低温）で培養すればPBP遺伝子を細胞内に保持し、温度感受性複製制御領域が機能しない温度（例えば高温）で培養すればPBP遺伝子を欠損する。以下の記載において、温度感受性プラスミドが複製不能な温度を高温として説明するが、これは低温である可能性を排除する意図ではなく、低温では複製不能であり、高温では複製可能な温度感受性複製制御領域が得られれば、これを用いてもよい。

尚、本発明に用いる微生物として、染色体DNA上のPBP遺伝子を破壊し、正常なPBP遺伝子をプラスミド上に保持させた後に $recA^-$ にした株を用いると、低温で培養中にプラスミド上のPBP遺伝子が染色体へ組み込まれるのを防ぎ、遺伝子の脱落を確実にすることができる点で好ましい。

温度感受性複製制御領域は、コリネ型細菌細胞内で自律増殖可能であり薬剤耐性を有するプラスミドを変異処理し、そのプラスミドでコリネ型細菌を形質転換し、薬剤を含む培地で低温では生育でき、高温では生育できない形質転換株からプラスミドを回収することによって得られる。

プラスミドの変異処理は、例えばプラスミドをインビトロでヒドロキシルアミン処理する方法（G. O. Humpherys, et al., Molec. gen. Genet., 145, 101-108 (1976) などがある）が挙げられる。

ここでいう「低温」とは、「高温」に対する相対的な概念であり、低温と高温との境界は特に制限されるものではないが、少なくとも「低温」とはコリネ型細菌を培養したときに増殖できる温度範囲であり、また、「高温」とはコリネ型細菌自体が死滅しない温度範囲である。これら低温と高温との境界は、温度感受性プラスミドを保持する形質転換体を、薬剤を含む培地で温度を変えて培養し、生育できない温度の下限を調べることによって、決定することができる。

コリネ型細菌細胞内で機能する温度感受性複製制御領域を有するプラスミドとしては、pHS4、pHS22、pHS23が挙げられる。また、pHS4から切り出したコリネ型細菌由来の複製制御領域を含むDNA断片を、エシェリヒア

・ コリ用のベクターである p H S G 3 9 8 に接続して得られたプラスミド p H S C 4 も、同様に温度感受性プラスミドとして本発明に使用することができる。 p H S C 4 は、コリネ型細菌、及びエシェリヒア・コリ中で自律増殖して、宿主にクロラムフェニコール耐性を付与する。 p H S C 4 を保持するエシェリヒア・コリ A J 1 2 5 7 1 は、1990年10月11日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 F E R M P - 1 1 7 6 3 として寄託され、1991年8月26日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、F E R M B P - 3 5 2 4 の受託番号で寄託されている。

これらの温度感受性プラスミドはコリネ型細菌細胞中において、約10～32℃では自律増殖できるが、約34℃以上では自律増殖できない。

温度感受性複製制御領域を有するDNA断片は、例えば上記 p H S C 4 を B a m H I と K p n I で切り出すことによって得られる。

尚、上記の各々のプラスミドの構築及びその温度感受性複製制御領域を含む領域の塩基配列は、特公平7-108228号公報に記載されている。

また、エシェリヒア・コリでは、ペニシリン結合蛋白遺伝子の中いくつかは遺伝子クラスターを形成し、murE遺伝子とPBP3遺伝子(ftsI)は近接していることが知られている(Ishino, F. Nippon Nogeikagaku Kaishi, vol.63, No.11, 1755-1764 (1989))。したがって、コリネ型細菌ですでに取得されているmurE温度感受性変異株を宿主として、コリネ型細菌由来の染色体DNAを含むプラスミドで形質転換し、宿主が生育できない温度で生育可能となった形質転換株を取得すれば、murE遺伝子とともにPBP遺伝子が取得される可能性がある。本発明者らは、後記実施例に示すようにこの着想に基づいてPBP遺伝子を取得することに成功した。

さらに、本発明によりPBP遺伝子及びその隣接領域の塩基配列が明らかにされたので、同配列に基づいてプライマーを作製し、コリネ型細菌染色体DNAを鋳型とするPCR(ポリメラーゼチェーンリアクション: polymerase chain reaction; White, T.J. et al., Trends Genet., 5, 185 (1989) 参照)を行うことによって、容易にPBP遺伝子を取得することができる。

後記実施例で取得されたPBP遺伝子を含む塩基配列を配列表の配列番号1に

示す。この塩基配列中には、三つのオープン・リーディング・フレーム (ORF) (塩基番号 881~2623、2790~4454、4467~5345 が存在する。それぞれの ORF がコードし得る アミノ酸配列を、配列番号 2~4 に示す。

上記アミノ酸配列について既知のデータベースに対して相同性検索を行ったところ、一番目の ORF がコードするアミノ酸配列は、エシェリヒア・コリの PBP3 遺伝子 (ftsI) とアミノ酸レベルで約 31% の相同性を示した。また、2 番目及び 3 番目の ORF がコードするアミノ酸配列は、それぞれエシェリヒア・コリの murE 遺伝子及び murF 遺伝子と相同性を有していた。以上のことから、一番目の ORF がエシェリヒア・コリの ftsI に相当する PBP 遺伝子であることが示唆された。

本発明の PBP 遺伝子は、コードされる蛋白質のペニシリンに結合する活性が損なわれない限り、1 若しくは複数の位置での 1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含む蛋白質をコードするものであってもよい。ここで、「数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なる。それは、イソロイシンとバリンのように、アミノ酸によっては、類縁性の高いアミノ酸が存在し、そのようなアミノ酸の違いが、蛋白質の立体構造に大きな影響を与えないことに由来する。従って、蛋白質を構成するアミノ酸配列全体に対し、30 から 40% 以上、好ましくは 55~65% 以上の相同性を有し、ペニシリン結合活性を有するものであってもよい。

上記のようなペニシリン結合蛋白と実質的に同一の蛋白質をコードする DNA は、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むように塩基配列を改変することによって得られる。また、上記のような改変された DNA は、従来知られている変異処理によっても取得され得る。変異処理としては、ペニシリン結合蛋白をコードする DNA をヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、及びペニシリン結合蛋白をコードする DNA を保持する微生物、例えばエシェリヒア属細菌を、紫外線照射または N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。

また、上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位等には、ペニシリン結合蛋白を保持する微生物の個体差、種や属の違いに基づく場合などの天然に生じる変異 (mutant又はvariant) も含まれる。

上記のような変異を有するDNAを、適当な細胞で発現させ、発現産物のペニシリン結合活性を調べることにより、ペニシリン結合蛋白と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。また、変異を有するペニシリン結合蛋白コードするDNAまたはこれを保持する細胞から、例えば配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号881～2623からなる塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ペニシリン結合活性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、ペニシリン結合蛋白と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。ここでいう「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば50%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

このような条件でハイブリダイズする遺伝子の中には途中にストップコドンが発生したものや、活性中心の変異により活性を失ったものも含まれるが、それらについては、市販の活性発現ベクターにつなぎペニシリン結合活性を測定することによって容易に取り除くことができる。

<3> L-グルタミン酸の生産

上記のようなPBPが正常に機能しておらず、かつ、L-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌を液体培地に培養し、培養液中にL-グルタミン酸を生成蓄積させ、これを採取することにより、L-グルタミン酸の製造することができる。本発明の方法によれば、モラセスのような十分量のビオチンを含む培地で、

ビオチン作用抑制物質を添加することなくL-グルタミン酸を製造することができる。

用いるコリネ型細菌が、第1の温度ではPBPが正常に機能し、第2の温度ではPBPが正常に機能しない細菌である場合には、該細菌を、第1の温度で培養して増殖させた後、第2の温度にシフトして培養し、L-グルタミン酸を産生させる。

温度シフトの態様として、具体的には、種培養を低温で行い、主発酵培地での培養（本培養）を高温で行う方法が挙げられる。また、前培養の途中、又は本培養の途中で温度シフトを行ってもよい。尚、菌体の増殖工程とプラスミドの脱落工程は、明確に区分されるものではなく、プラスミドの脱落工程は菌体の増殖を伴う。

温度シフトのタイミングは、温度シフトまでの培養時間を変えて予備実験を行うことにより、低温での培養時間を容易に決定することができる。一般的には、対数増殖期において所望の細胞密度に達するまで培養した後、プラスミドが複製不能な温度にシフトすればよい。

培養に用いる培地は特に制限されず、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機微量栄養素を含有する通常の培地を用いることができる。特に、本発明においては十分量のビオチンを含む培地を用いることができる。

炭素源としては、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトースや澱粉加水分解物などの糖類、エタノールやイノシトールなどのアルコール類、酢酸、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類を用いることができる。

窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。

無機イオンとしては、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。有機微量栄養素としては、ビタミンB₁などの要求物質または酵母エキス等を必要に応じ適量含有させることが望ましい。

培養は好氣的条件下で16～72時間実施するのがよく、培養温度は20℃～45℃に、培養中pHは5～8.5に制御する。尚、pH調整には無機あるいは

有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができ
る。

発酵液からのL-グルタミン酸の採取は通常イオン交換樹脂法、沈澱法その他の
公知の方法を組み合わせることにより実施できる。

図面の簡単な説明

図1は、PBP3とペニシリンGとの結合に対するメシリナムの阻害を示すグ
ラフ図。矢印は、最小阻止濃度を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施例を説明する。

実施例1 コリネ型細菌のPBPの検出

コリネ型細菌のPBPの検出は、上記Spratt等の方法を基本とし、具体的には
以下の方法で行った。

<1>膜画分の調製

PBPは膜蛋白質であると考えられている。コリネ型細菌の膜画分の調製は以
下の通りに行った。コリネ型細菌野生株ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメン
タム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869株を20mlのA培地（ポリ
ペプトン10g、酵母エキス5g、NaCl 5g、グルコース5gを水1L中に
含む）に植菌し、30℃にて振とう培養し、660nmの吸光度が約1.0にな
ったところで集菌し、50mM、pH7.0のリン酸ナトリウムバッファーにて
洗浄した。その後、同バッファー中にガラスビーズを添加し、超音波処理を行い
菌体を破碎した。遠心により破碎残渣を除去した後、100,000×gで30分超遠心
し、膜画分を回収した。得られた画分を同バッファーを用いて洗浄し、最終的に
500μlの同バッファーに懸濁したものを膜画分とした。この膜画分の蛋白質
濃度を蛋白質定量キット（PIERCE社製、Micro BCA Protein assay kit）を用いて

定量したところ、 4 mg/ml であった。

<2>ペニシリン結合反応

調製した膜面分 $30\text{ }\mu\text{l}$ に $3\text{ }\mu\text{l}$ の ^{14}C -ペニシリンG (Amersham社製) を添加し、 30°C 、 10 分反応させた後、 $2\text{ }\mu\text{l}$ の 15% ザルコシル (N-ラウロイルザルコシンナトリウム) および 45 mg/ml のペニシリンGを加え、室温にて 20 分間放置した。 $13,000\text{ rpm}$ 、 30 分、 20°C 遠心により可溶性画分を取得した。このサンプルを 10% のポリアクリルアミドを含むゲルを用いてSDS-PAGEを行い、ゲルを固定、乾燥した後、富士フィルム社製イメージアナライザーBAS2000にて解析した。その結果、 110 kDa 、 100 kDa 、および 60 kDa の3つのバンドが検出され、それぞれをPBP1、PBP2、およびPBP3と命名した。

<3>PBP結合阻害剤を用いた解析

ペニシリンGの誘導体であるメシリナムとPBPとの親和性を調べた。方法は、上記のペニシリン結合反応前にメシリナムを濃度を変化させて添加し、同位体(^{14}C) 標識したペニシリンGとの結合の阻害度を調べることにより誘導体とPBPとの親和性を調べた。その結果、メシリナム添加によりPBP3のみが標識ペニシリンGとの結合が阻害された。すなわち、メシリナムはPBP3と選択的に結合することが明らかとなった(図1)。

実施例2 メシリナム添加によるコリネ型細菌のグルタミシ酸生産

上記A培地にブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869株を植菌し、 30°C 、 2 時間振とう培養後、 $0.01\text{ }\mu\text{M}$ ~ $100\text{ }\mu\text{M}$ のメシリナムを添加し、さらに 8 時間振とう培養を行った。その後、培地中のグルタミシ酸濃度をバイオテックアナライザーAS210 (旭化成社製) を用いて測定した(表1)。

表 1

添加メシリナム濃度 (μ M)	L-グルタミン酸濃度 (mg/L)
0	0
0.1	0
1.0	0
10	0
100	575

メシリナム添加によりL-グルタミン酸を生成している条件下で、メシリナムと結合するのはPBP 3のみであることから、ペニシリンまたはメシリナムによるグルタミン酸の生成は、少なくともPBP 3機能を阻害することにより引き起こされることが示された。

実施例 3 プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869の PBP遺伝子のクローニング

(1) プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869の染色体DNAの調製

プレビバクテリウム ラクトファーメンタム ATCC13869株を、10 mlのL培地（1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、0.5% NaCl、0.1%グルコース、[pH 7.2]）にて一晚培養後、集菌した。菌体を50 mM トリス塩酸、50 mM EDTA (pH 8.0) 緩衝液により洗浄した後、菌体を800 μ lの同緩衝液に懸濁した。

上記の菌体懸濁液に、50 ml/ml リゾチーム溶液を40 μ l、および10 mg/ml リボヌクレアーゼ溶液を20 μ l 添加し、37℃で1時間インキュベートした。これに、20% SDS溶液を20 μ l 添加し、70℃で1時間インキュベートした。続いて、20 mg/ml プロテナーゼK溶液を24 μ l 添加し、50℃で1時間インキュベートした後、さらにプロテナーゼK溶液を24 μ l 添加して1時間インキュベートした。

上記のようにして得られた溶菌液に、等量のフェノールを加えて攪拌した後、4℃で一晩、放置し、遠心分離して水層を回収した。この水層を、さらにフェノール／クロロホルムにて2時間、クロロホルム／イソアミルアルコールにて30分間抽出した。抽出は、攪拌後指定時間放置した後、遠心分離して水層を回収することにより行った。得られた抽出液からエタノール沈殿によりDNAを回収した。DNAの沈殿は、300 μ lのTE緩衝液（10 mMトリス塩酸、1 mM EDTA [pH 8.0]）に溶解した。

（2）ブレビバクテリウム ラクトファーメンタム ATCC13869の染色体DNAライブラリーの作製

上記のようにして得られたブレビバクテリウム ラクトファーメンタム ATCC13869の染色体DNA及びエシェリヒア・コリの高コピーベクター pHSG398（宝酒造（株））を、制限酵素HindIII（宝酒造（株））で切断した。これらのDNAを適量ずつ混合し、Takara DNA Ligation Kit ver.2（宝酒造（株））を用いて連結し、ブレビバクテリウム ラクトファーメンタム ATCC13869の染色体DNAライブラリーを構築した。

（3）PBP遺伝子クローンの選択

上記のようにして得られたブレビバクテリウム ラクトファーメンタム ATCC13869の染色体DNAライブラリーで、エシェリヒア・コリのmurE変異株 TLK11（murE温度感受性変異、J. Bacteriol., 1972, 110:41-46）を形質転換し、20 μ g/mlのクロラムフェニコールを含むL寒天培地（1.5%アガーを含むL培地）にて、42℃で一晩培養した。

生じたコロニーをL液体培地に接種して培養し、得られた菌体からプラスミドを回収したところ、約5.3 kbのHindIII断片がクローン化されていた。このプラスミドをpHSGH-Hと命名した。

（4）クローン化されたDNA断片の塩基配列の決定

上記のクローン化断片について、Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP（アマシャム ファルマシア バイオテック社）を用いたダイデオキシ反応を行い、DNAシーケンサーDSQ-1000L（島津製作所）を用いて塩基配列を決定した。決定された塩基配列を、

配列番号 1 に示す。

実施例 4 ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムの

P B P 遺伝子破壊株の作製

染色体上の P B P 遺伝子が破壊されたブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムを、特開平 5-7491 号に示される温度感受性プラスミドを用いた相同組換え法により創製した。

pHSGH-H を鋳型とし、配列番号 5 及び 6 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして、P C R を行い、P B P 遺伝子断片を増幅した。配列番号 5 に示すプライマーは配列番号 1 に示す塩基配列において塩基番号 31~50 に相当する配列を含み、配列番号 6 に示すプロモーターは配列番号 1 に示す塩基配列において塩基番号 2991~3014 に相当する配列を含み、それぞれ 5' 末端側に EcoRI 認識配列を有している。P C R 反応は、市販の P C R 反応装置（宝酒造（株）製 D N A サーマルサイクラー PJ2000 型等）を使用し、Taq DNA ポリメラーゼ（宝酒造（株））を用い、供給者により指定された方法に従って行った。

得られた増幅断片を EcoRI で処理し、pHSG299（宝酒造（株）製）の EcoRI 部位に挿入し、pHSGE を作製した。一方、コリネ型細菌用温度感受性プラスミド p H S C 4 を BamHI および KpnI で消化し、複製制御領域を含む遺伝子断片を取得し、得られた断片を宝酒造（株）製 Blunting kit を用い平滑末端化した後、XbaI リンカー（宝酒造（株）製）を用いて pHSGE の XbaI 部位に挿入し、pHSGX を作製した。次に、pHSGX を BamHI および KpnI で消化し、宝酒造（株）製 Blunting kit で平滑末端化した後、Takara DNA Ligation Kit ver.2（宝酒造（株））を用いてセルフライゲーションを行った。得られたプラスミド pHSGX ΔBK は、P B P 遺伝子内部を欠失している。

上記のようにして得られた P B P 遺伝子置換用プラスミド pHSGX ΔBK を用いて、二回組換え法により、欠失型 P B P 遺伝子とブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムの染色体 D N A 上の P B P 遺伝子との遺伝子置換を行った。具体的には、以下のようにして行った。ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869 を、pHSGX ΔBK を用いて電気パルス法（特開平 2-207791 号公報参照）に

より形質転換した。形質転換体を、M-CM2 G液体培地で25℃にて6時間振とう培養した後、25 μ g/mlのカナマイシンを含むM-CM2 G培地上に撒き、34℃でコロニーを形成した株を取得した。

得られた株は、欠失型PBP遺伝子が染色体上にもともと存在するPBP遺伝子との組換えを起こし、染色体上のPBP遺伝子と欠失型PBP遺伝子との融合遺伝子2個が組換えDNAの他の部分（ベクター部分、温度感受性複製制御領域及び薬剤耐性マーカー）を挟んだ状態で染色体に挿入されている。したがって、この状態では正常なPBP遺伝子が優性であるので、形質転換株は高温でも生育することができる。

次に、形質転換株を25℃で培養した後、25℃で生育することができ、34℃で生育できない株の中から、染色体上のPBP遺伝子が欠失型に置換された株を選択し、 Δ P3/p3株と名付けた。 Δ P3/p3株は、欠失型PBP遺伝子が染色体DNA上に残され、正常なPBP遺伝子を含むプラスミドが細胞中に存在する。染色体上のPBP遺伝子が欠失型に変化していることの確認は、欠失部分のつなぎ目の塩基配列を決定することにより行った。

産業上の利用可能性

本発明により、コリネ型細菌のペニシリン結合蛋白をコードする遺伝子（PBP遺伝子）が提供される。同遺伝子を用いて染色体上のPBP遺伝子が破壊されたコリネ型細菌を用いることにより、十分量のビオチン存在下で、ビオチン作用抑制物質を添加せずにL-グルタミン酸を製造することができる。

請求の範囲

1. ペニシリン結合蛋白が正常に機能しておらず、かつ、L-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌を液体培地に培養し、培養液中にL-グルタミン酸を生成蓄積させ、これを採取することを特徴とするL-グルタミン酸の製造法。
2. 前記コリネ型細菌が、第1の温度ではペニシリン結合蛋白が正常に機能し、第2の温度ではペニシリン結合蛋白が正常に機能しない細菌であり、
該細菌を、第1の温度で培養して増殖させる工程と、第2の温度で培養してL-グルタミン酸を産生させる工程とを含む、請求項1記載の方法。
3. 前記コリネ型細菌が、ペニシリン結合蛋白をコードする遺伝子（PBP遺伝子）と温度感受性複製制御領域とを含むプラスミドを保持し、かつ染色体上のPBP遺伝子が機能しない細菌であり、第1の温度では前記プラスミドが複製可能であり、第2の温度では前記プラスミドが複製不能である請求項2記載の方法。
4. 前記コリネ型細菌が産生するペニシリン結合蛋白が温度感受性変異を有する請求項2記載の方法。
5. 前記ペニシリン結合蛋白が、ペニシリンGを結合させたときにSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量約60,000を示す蛋白質である請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
6. 前記ペニシリン結合蛋白が、配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列を有する請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
7. 前記PBP遺伝子が、配列表の配列番号1に示す塩基配列のうち少なくとも塩基番号881～2623で表される塩基配列を有する請求項3記載の方法。
8. 下記（A）又は（B）に示す蛋白質をコードするDNA。
（A）配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質。

(B) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ペニシリンに結合する活性を有する蛋白質。

9. 下記 (a) 又は (b) に示す DNA である請求項 7 記載の DNA。

(a) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号 881 ~ 2623 からなる塩基配列を含む DNA。

(b) 配列表の配列番号 に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号 881 ~ 2623 からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ペニシリンに結合する活性を有する蛋白質をコードする DNA。

1 / 1

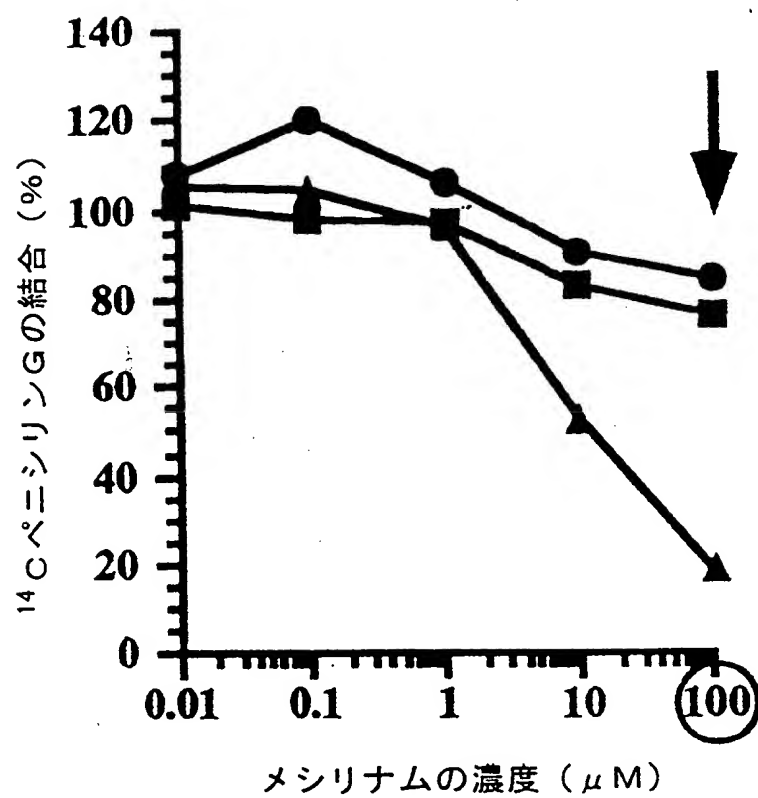


Fig. 1

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> 味の素株式会社 (Ajinomoto Co., Inc.)

<120> ペニシリン結合蛋白遺伝子及びL-グルタミン酸の製造法
(A Gene Coding for Penicillin Binding Protein and a
Method for Producing L-Glutamic Acid)

<130> OP846-PCT

<141> 1999-03-05

<150> JP 10-55608

<151> 1998-03-06

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 5347

<212> DNA

<213> Brevibacterium lactofermentum

<220>

<221> CDS

<222> (881)..(2623)

<220>

<221> CDS

<222> (2790)..(4454)

<220>

<221> CDS

<222> (4467)..(5345)

<400> 1

aagcttcggg gaggggcgcg tcgataagca cgcaacctcg tcgtgacatg gcgccggaaa 60
ggaaacaacc cgggcccctgg tgaaccctgg cgtgcagcaa cgcgtaattg atgcagcaca 120
agctgggctc tcagcaggtt atgtcggtgc gtggtcgccg cgttgaggca aaacgtgctg 180
atcctaaggt gatccagctg tctgtgctgg tggttatcct gctgtgcgtt ggtgttggcg 240
cgaccatggg tctgtccgga acgtctacac agcagacttt ccagttgcag gaacttcagg 300
caactgaaac ggatttgagc aatcgcatgt agtctctcaa ccgagatgtg gaagatgctc 360
gctcagcagc aaccttggca gcgaatgcta cggagatggg cttggtatcc ccagtggaac 420
ctggcgtgct cgcagtgtag gaaaacgggt atgttgtgga ggagcgcgaa caaatccaga 480
gacacgccct atagttgaca tcaatggaca acagaccga ccaaatcggg catcaagcaa 540
ccctgacgag actaacgcat actgaaaacc tccaggcgat tccacaagaa gcagcagctc 600

cgccgtatca gaccaacact gttccttatg ctgcaaccac cggacaagca ggtggcgcag	660
ggcagtgact ttccccagca atggcagaag tctggggcgag cgtgcgggac gtgaagatac	720
gtccccccgt tctggcgatc aggacgaaag cagaagagcc gctagagagc gcgaacttac	780
gcgacgcagc ggtaaagcta aaggcgtaaa ccaagaagaa ggagtgcact accggcctaa	840
atcttcaacc cagggcggcg cācgcaagcg acgtgtgaac atg gtt acc cgt atc	895
Met Val Thr Arg Ile	
1 5	
gca ttg gtc atc gct ggc gta ctg atc att cgc ctc ggc tgg gtc caa	943
Ala Leu Val Ile Ala Gly Val Leu Ile Ile Arg Leu Gly Trp Val Gln	
10 15 20	
gtt gtc tgg gga cca gaa ctg tcc ctc aat gct tct gaa cag cgc acc	991
Val Val Trp Gly Pro Glu Leu Ser Leu Asn Ala Ser Glu Gln Arg Thr	
25 30 35	
cgc gtg tac gta gat cct gca cgc cgt gga acc atc gtg gac cgc gaa	1039
Arg Val Tyr Val Asp Pro Ala Arg Arg Gly Thr Ile Val Asp Arg Glu	
40 45 50	
gga aac cag atg gcg tac acg atg cag gca cgt tct ctg acg gtt tct	1087
Gly Asn Gln Met Ala Tyr Thr Met Gln Ala Arg Ser Leu Thr Val Ser	
55 60 65	
ccg aac atc atg cgt gag gaa tta aag acc gga act gat ctg gcc ttg	1135
Pro Asn Ile Met Arg Glu Glu Leu Lys Thr Gly Thr Asp Leu Ala Leu	
70 75 80 85	
cgt ttg gcg gct gaa gaa acc gat ccg gaa aac gtg gcc agc tat gtg	1183
Arg Leu Ala Ala Glu Glu Thr Asp Pro Glu Asn Val Ala Ser Tyr Val	
90 95 100	
acc atc gaa gaa ggc aac gcg tat gtt ttt gcg tct gaa gaa cag cgc	1231
Thr Ile Glu Glu Gly Asn Ala Tyr Val Phe Ala Ser Glu Glu Gln Arg	
105 110 115	
gaa acc att ctg tcc gac aag gta gaa gag cgt att caa agc att gcg	1279
Glu Thr Ile Leu Ser Asp Lys Val Glu Glu Arg Ile Gln Ser Ile Ala	
120 125 130	
gat cgg atc cct gag atc atc aaa tcc cat gac caa gat gtc act gga	1327
Asp Arg Ile Pro Glu Ile Ile Lys Ser His Asp Gln Asp Val Thr Gly	
135 140 145	
att tcc tct gag gag atc ctg gac aag ctc aat gca gat agc cag tat	1375
Ile Ser Ser Glu Glu Ile Leu Asp Lys Leu Asn Ala Asp Ser Gln Tyr	
150 155 160 165	
gag gtg ctc gtc cgc aat gtt gat ccc gat gta gcg tca gaa atc acc	1423
Glu Val Leu Val Arg Asn Val Asp Pro Asp Val Ala Ser Glu Ile Thr	
170 175 180	
gat gag atg ccc agc gtc gca gct gat cat caa gac atc cgc caa tac	1471

Asp	Glu	Met	Pro	Ser	Val	Ala	Ala	Asp	His	Gln	Asp	Ile	Arg	Gln	Tyr		
			185					190					195				
cca	aac	ggc	gcg	att	ggt	gaa	aac	atc	atc	ggt	cga	atc	agc	atg	gac	1519	
Pro	Asn	Gly	Ala	Ile	Gly	Glu	Asn	Ile	Ile	Gly	Arg	Ile	Ser	Met	Asp		
		200					205					210					
ggc	gaa	ggc	cag	ttc	ggc	ttt	gag	gct	tcc	aac	gat	tcc	ctg	ttg	gca	1567	
Gly	Glu	Gly	Gln	Phe	Gly	Phe	Glu	Ala	Ser	Asn	Asp	Ser	Leu	Leu	Ala		
	215					220					225						
gga	aac	aac	ggt	cgc	tca	acc	cag	gac	atg	tcc	att	ttg	gga	caa	gca	1615	
Gly	Asn	Asn	Gly	Arg	Ser	Thr	Gln	Asp	Met	Ser	Ile	Leu	Gly	Gln	Ala		
230					235				240						245		
atc	ccg	ggc	acg	ttg	agg	gat	caa	att	cca	gcc	att	gat	ggt	gcc	agc	1663	
Ile	Pro	Gly	Thr	Leu	Arg	Asp	Gln	Ile	Pro	Ala	Ile	Asp	Gly	Ala	Ser		
				250				255						260			
gtt	gaa	ctc	acc	gtt	gat	ctg	gat	ctg	caa	acc	tat	gtg	cag	cag	gca	1711	
Val	Glu	Leu	Thr	Val	Asp	Leu	Asp	Leu	Gln	Thr	Tyr	Val	Gln	Gln	Ala		
			265				270						275				
ttg	gag	cag	gcg	aaa	gct	aac	tcc	ggt	gca	gaa	aac	gcc	tcc	gct	gtg	1759	
Leu	Glu	Gln	Ala	Lys	Ala	Asn	Ser	Gly	Ala	Glu	Asn	Ala	Ser	Ala	Val		
		280					285					290					
gtt	ctt	gat	gcc	gag	acc	gct	gag	gtt	ttg	gcg	atg	gca	aac	acc	gat	1807	
Val	Leu	Asp	Ala	Glu	Thr	Ala	Glu	Val	Leu	Ala	Met	Ala	Asn	Thr	Asp		
	295					300					305						
acc	atc	aac	ccc	aac	gaa	gac	acg	gga	aag	cag	att	gag	cag	ggc	aag	1855	
Thr	Ile	Asn	Pro	Asn	Glu	Asp	Thr	Gly	Lys	Gln	Ile	Glu	Gln	Gly	Lys		
310					315					320					325		
agc	ttt	gac	aat	cct	tct	gtc	acc	cac	ccc	ttc	gag	cct	ggt	tct	gta	1903	
Ser	Phe	Asp	Asn	Pro	Ser	Val	Thr	His	Pro	Phe	Glu	Pro	Gly	Ser	Val		
				330					335					340			
gcc	aag	gtg	att	act	gca	gca	ggc	gta	att	caa	gac	ggc	ttg	act	act	1951	
Ala	Lys	Val	Ile	Thr	Ala	Ala	Gly	Val	Ile	Gln	Asp	Gly	Leu	Thr	Thr		
			345					350					355				
cca	gat	gaa	gtg	ttg	cag	gta	ccg	ggc	agt	att	gaa	atg	gcc	ggt	gtt	1999	
Pro	Asp	Glu	Val	Leu	Gln	Val	Pro	Gly	Ser	Ile	Glu	Met	Ala	Gly	Val		
		360					365					370					
tct	gtc	ggt	gat	gcg	tgg	gac	cac	ggt	gtc	gtt	ccc	tat	acc	act	gca	2047	
Ser	Val	Gly	Asp	Ala	Trp	Asp	His	Gly	Val	Val	Pro	Tyr	Thr	Thr	Ala		
	375					380					385						
gga	att	ttt	ggt	aag	tcc	tcg	aat	gta	ggc	act	ctg	atg	ctt	gcg	cac	2095	
Gly	Ile	Phe	Gly	Lys	Ser	Ser	Asn	Val	Gly	Thr	Leu	Met	Leu	Ala	His		
390					395					400					405		
ggt	ctt	ggt	gaa	gat	aaa	ttt	gct	gat	tac	ctg	gaa	cga	ttc	ggt	gtg	2143	
Gly	Leu	Gly	Glu	Asp	Lys	Phe	Ala	Asp	Tyr	Leu	Glu	Arg	Phe	Gly	Val		
				410					415					420			

gga cag tca acg ggt att gag ctt ccg agc gaa tcc caa ggc ctg ctg 2191
 Gly Gln Ser Thr Gly Ile Glu Leu Pro Ser Glu Ser Gln Gly Leu Leu
 425 430 435

ccc gca cgt gag cag tgg tct ggc ggt act ttt gct aac ctg ccc atc 2239
 Pro Ala Arg Glu Gln Trp Ser Gly Gly Thr Phe Ala Asn Leu Pro Ile
 440 445 450

ggt cag ggt atg tcg atc acc acg ttg caa atg gct gga atc tac caa 2287
 Gly Gln Gly Met Ser Ile Thr Thr Leu Gln Met Ala Gly Ile Tyr Gln
 455 460 465

gcc ttg gcc aac gat ggt gaa cgc att gaa ccg cgg atc atc aag agc 2335
 Ala Leu Ala Asn Asp Gly Glu Arg Ile Glu Pro Arg Ile Ile Lys Ser
 470 475 480 485

gtg act gat tct gac gga aca gtc cta gag cag ccg gaa ccc gat aaa 2383
 Val Thr Asp Ser Asp Gly Thr Val Leu Glu Gln Pro Glu Pro Asp Lys
 490 495 500

acc cag gtt gtc agc gct gaa gct gcc cgc acc acg gtg gat atg ttt 2431
 Ile Gln Val Val Ser Ala Glu Ala Ala Arg Thr Thr Val Asp Met Phe
 505 510 515

agg tct gtc acc cag gtt gat cca ctt gga gtg cac aag gta ccg ctc 2479
 Arg Ser Val Thr Gln Val Asp Pro Leu Gly Val His Lys Val Pro Leu
 520 525 530

cag acg cct cca ttg agg gtt atc aaa tct cag gta aga cag gta cgg 2527
 Gln Thr Pro Pro Leu Arg Val Ile Lys Ser Gln Val Arg Gln Val Arg
 535 540 545

cgc aaa aag ttg acc cca aca cgg gcg cgt act cta act cgc aat act 2575
 Arg Lys Lys Leu Thr Pro Thr Arg Ala Arg Thr Leu Thr Arg Asn Thr
 550 555 560 565

gga tta cct tct cgg gta ttg cac ccg ctg atg atc ctc gat ttg ttg 2623
 Gly Leu Pro Ser Arg Val Leu His Pro Leu Met Ile Leu Asp Leu Leu
 570 575 580

tagccatcat gcttgatgag ccagaacgag gaggccacgg tgggtggcggc caaacgcag 2683

caccctttgtt caaagacatc gccacctggt tgcctcaaccg cgacaacatc ccactgtctg 2743

cagccaccga accgatcatc cttcaagctc aataactcaa acagaa gtg tct ttt 2798
 Val Ser Phe
 1

gta gaa ttt cat aat ctg aac ttt tgt ttg aac tct ttt cgg cat cac 2846
 Val Glu Phe His Asn Leu Asn Phe Cys Leu Asn Ser Phe Arg His His

cca cgt gcc gcg tcc gaa tta tta aca cct aga aac ctg tgg agg aga 2894
 Pro Arg Ala Ala Ser Glu Leu Leu Thr Pro Arg Asn Leu Trp Arg Arg
 20 25 30 35

gaa aac cat ggc aac cac gtt gct gga cct cac caa act tat cga tgg 2942
 Glu Asn His Gly Asn His Val Ala Gly Pro His Gln Thr Tyr Arg Trp

40										45					50					
cat His	cct Pro	caa Gln	ggg Gly 55	ctc Leu	tgc Cys	cag Gln	ggc Gly	gtt Val 60	ccc Pro	gct Ala	cac His	gca Ala	gta Val 65	ggg Gly	gaa Glu	2990				
caa Gln	gca Ala	atc Ile 70	gcg Ala	gct Ala	att Ile	ggg Gly	ctt Leu 75	gac Asp	tcc Ser	tcc Ser	agc Ser	ttg Leu 80	cct Pro	acc Thr	tgc Ser	3038				
gac Asp	gct Ala 85	att Ile	ttt Phe	gct Ala	gca Ala	gtt Val 90	cca Pro	gga Gly	acc Thr	cgc Arg	act Thr 95	cac His	ggc Gly	gca Ala	cag Gln	3086				
ttt Phe 100	gca Ala	ggg Gly	acg Thr	gat Asp	aac Asn 105	gct Ala	gcg Ala	aaa Lys	gct Ala	gtg Val 110	gcc Ala	att Ile	ttg Leu	act Thr	gac Asp 115	3134				
gca Ala	gct Ala	gga Gly	ctt Leu	gag Glu 120	gtg Val	ctc Leu	aac Asn	gaa Glu	gca Ala 125	gga Gly	gag Glu	acc Thr	cgc Arg	cca Pro 130	atc Ile	3182				
atc Ile	gtt Val	gtt Val	gat Asp 135	gat Asp	gtc Val	cgc Arg	gca Ala	gta Val 140	ctt Leu	ggc Gly	gca Ala	gca Ala	tca Ser 145	tca Ser	agc Ser	3230				
att Ile	tat Tyr	ggc Gly 150	gat Asp	cct Pro	tca Ser	aaa Lys	gat Asp 155	ttc Phe	acg Thr	ctc Leu	att Ile	gga Gly 160	gtc Val	act Thr	gga Gly	3278				
acc Thr	tca Ser 165	ggg Gly	aaa Lys	acc Thr	acc Thr	acc Thr	agc Ser 170	tac Tyr	ctc Leu	ttg Leu	gaa Glu 175	aaa Lys	gga Gly	ctc Leu	atg Met	3326				
gag Glu 180	gca Ala	ggc Gly	cac His	aaa Lys	gtt Val 185	ggg Gly	ttg Leu	atc Ile	ggc Gly	acc Thr 190	aca Thr	ggg Gly	aca Thr	cgt Arg	ata Ile 195	3374				
gat Asp	ggg Gly	gaa Glu	gaa Glu	gta Val 200	ccc Pro	acg Thr	aag Lys	ctc Leu	acc Thr 205	act Thr	cca Pro	gaa Glu	gcg Ala	ccg Pro 210	act Thr	3422				
ctg Leu	cag Gln	gca Ala	ttg Leu 215	ttt Phe	gct Ala	cga Arg	atg Met	cgc Arg 220	gat Asp	cac His	ggg Gly	gtc Val	acc Thr 225	cac His	gtg Val	3470				
gtg Val	atg Met	gaa Glu 230	gta Val	tcc Ser	agc Ser	cat His	gca Ala 235	ttg Leu	tca Ser	ttg Leu	ggc Gly	agg Arg 240	gtt Val	gcg Ala	ggg Gly	3518				
tcc Ser	cac His 245	ttt Phe	gat Asp	gta Val	gct Ala	gcg Ala 250	ttt Phe	acc Thr	aac Asn	ctg Leu	tgc Ser 255	cag Gln	gat Asp	cac His	ctt Leu	3566				
gat Asp 260	ttc Phe	cac His	ccc Pro	acc Thr	atg Met 265	gat Asp	gat Asp	tac Tyr	ttt Phe	gac Asp 270	gcg Ala	aag Lys	gca Ala	ttg Leu	ttc Phe 275	3614				

ttc cgc gca gat tct cca ctt gtg gct gac aaa cag gtc gtg tgc gtg	3662
Phe Arg Ala Asp Ser Pro Leu Val Ala Asp Lys Gln Val Val Cys Val	
280 285 290	
gat gat tct tgg ggt cag cgc atg gcc agc gtg gca gcg gat gtg caa	3710
Asp Asp Ser Trp Gly Gln Arg Met Ala Ser Val Ala Ala Asp Val Gln	
295 300 305	
aca gta tcc acc ctt ggg caa gaa gca gac ttc agc gct aca gat atc	3758
Thr Val Ser Thr Leu Gly Gln Glu Ala Asp Phe Ser Ala Thr Asp Ile	
310 315 320	
aat gtc agc gac tct ggc gcc cag agt ttt aag atc aac gcc ccc tca	3806
Asn Val Ser Asp Ser Gly Ala Gln Ser Phe Lys Ile Asn Ala Pro Ser	
325 330 335	
aac cag tcc tac cag gtc gag cta gcc ctt cca ggt gcg ttc aac gtt	3854
Asn Gln Ser Tyr Gln Val Glu Leu Ala Leu Pro Gly Ala Phe Asn Val	
340 345 350 355	
gct aac gcc acg ttg gca ttt gcc gct gcg gca ccg tgg gtg ttg atg	3902
Ala Asn Ala Thr Leu Ala Phe Ala Ala Ala Pro Trp Val Leu Met	
360 365 370	
gcg acg ttt gct cga ggc atg tcc aag gtc gcg gtt cca ggc cgt atg	3950
Ala Thr Phe Ala Arg Gly Met Ser Lys Val Ala Val Pro Gly Arg Met	
375 380 385	
gaa cgc att gat gag gga caa gac ttc ctt gca gtg gtg gat tat gcc	3998
Glu Arg Ile Asp Glu Gly Gln Asp Phe Leu Ala Val Val Asp Tyr Ala	
390 395 400	
cac aag cct gct gca gtg gct gct gtg ttg gat acg ttg agg acc cag	4046
His Lys Pro Ala Ala Val Ala Ala Val Leu Asp Thr Leu Arg Thr Gln	
405 410 415	
att gac ggg cgc ctc gga agt ggt tat cgg tgc tgg tgg aga cgc gat	4094
Ile Asp Gly Arg Leu Gly Ser Gly Tyr Arg Cys Trp Trp Arg Arg Asp	
420 425 430 435	
tcc acc aag cgt ggc ccc atg ggc agt tgt ccg cac agg tct gga tct	4142
Ser Thr Lys Arg Gly Pro Met Gly Ser Cys Pro His Arg Ser Gly Ser	
440 445 450	
agt tat tgt act gat gca aac ctc gtc aga gtg gct ggc acg att cgc	4190
Ser Tyr Cys Thr Asp Ala Asn Leu Val Arg Val Ala Gly Thr Ile Arg	
455 460 465	
gca gca gtc act gca gga gca cag cag ggt gct tca gag tcc gaa cga	4238
Ala Ala Val Thr Ala Gly Ala Gln Gln Gly Ala Ser Glu Ser Glu Arg	
470 475 480	
ccg gtg gaa gtc cta gaa att ggt gac cgt gca gaa gca att cgc gtt	4286
Pro Val Glu Val Leu Glu Ile Gly Asp Arg Ala Glu Ala Ile Arg Val	
485 490 495	
ttg gtc gag tgg gca cag cct gga gat ggc att gta gta gct gga aaa	4334
Leu Val Glu Trp Ala Gln Pro Gly Asp Gly Ile Val Val Ala Gly Lys	

500	505										510					515					
ggc cat gaa gtt gga caa cta gtt gct ggt gtc acc cac cat ttt gat	Gly His Glu Val Gly Gln Leu Val Ala Gly Val Thr His His Phe Asp	4382																			
	520	525	530																		
gac cgc gaa gaa ggt cgc gct gct ttg aca gaa aag ctc aac aat aaa	Asp Arg Glu Glu Gly Arg Ala Ala Leu Thr Glu Lys Leu Asn Asn Lys	4430																			
	535	540	545																		
ctt ccc ctt act acg gaa gaa gga taggccacag tc atg atc aca atg acc	Leu Pro Leu Thr Thr Glu Glu Gly Met Ile Thr Met Thr	4481																			
	550	555	1																		
ctt ggg gaa atc gct gac atc gtt gga ggc agg cta act ggc ggt gct	Leu Gly Glu Ile Ala Asp Ile Val Gly Gly Arg Leu Thr Gly Gly Ala	4529																			
5	10	15	20																		
caa gaa gat acg ctt gtg agc tcc agc gtg gaa ttt gat tct cga tcc	Gln Glu Asp Thr Leu Val Ser Ser Ser Val Glu Phe Asp Ser Arg Ser	4577																			
	25	30	35																		
ctc aca ccg ggt ggc ttg ttt tta gca ctt ccg ggt gct cgt gta gac	Leu Thr Pro Gly Gly Leu Phe Leu Ala Leu Pro Gly Ala Arg Val Asp	4625																			
	40	45	50																		
ggc cat gat ttt gct gca act gca att gag aaa ggt gcg gtc gca gta	Gly His Asp Phe Ala Ala Thr Ala Ile Glu Lys Gly Ala Val Ala Val	4673																			
	55	60	65																		
ttg gca gcc cgt gag gtt gac gta cct gcg atc gtc gtg cct cca gta	Leu Ala Ala Arg Glu Val Asp Val Pro Ala Ile Val Val Pro Pro Val	4721																			
	70	75	80																		
aaa atc cag gaa tcc aat gct gac att tat gct cat gaa cca gat ggg	Lys Ile Gln Glu Ser Asn Ala Asp Ile Tyr Ala His Glu Pro Asp Gly	4769																			
85	90	95	100																		
cat ggc gcg gcg gta gtg gag gcg ttg tct cgg ttg gct cgc cac gtg	His Gly Ala Ala Val Val Glu Ala Leu Ser Arg Leu Ala Arg His Val	4817																			
	105	110	115																		
gtg gat atc tgc gtg gct ggc cat caa ttg aac gtt gtg gct att act	Val Asp Ile Cys Val Ala Gly His Gln Leu Asn Val Val Ala Ile Thr	4865																			
	120	125	130																		
ggt tct gcg gga aag act tct acg aag gat ttc atc gcg acg gtt ctt	Gly Ser Ala Gly Lys Thr Ser Thr Lys Asp Phe Ile Ala Thr Val Leu	4913																			
	135	140	145																		
ggc caa gat ggg cca act gtg gca cct ccg ggc tcg ttt aac aat gag	Gly Gln Asp Gly Pro Thr Val Ala Pro Pro Gly Ser Phe Asn Asn Glu	4961																			
	150	155	160																		
ctt ggt ttg cca cac acc gtc cgc tgc aca acc gat act aag tat ttg	Leu Gly Leu Pro His Thr Val Arg Cys Thr Thr Asp Thr Lys Tyr Leu	5009																			
165	170	175	180																		

gtg gct gag atg tcc gcg cgt ggc att gga cat att aag cac ctg aca 5057
 Val Ala Glu Met Ser Ala Arg Gly Ile Gly His Ile Lys His Leu Thr
 185 190 195

gag att cgt ccg cca cgg att gca gct gtg ctc aac gtc ggc cat gcg 5105
 Glu Ile Arg Pro Pro Arg Ile Ala Ala Val Leu Asn Val Gly His Ala
 200 205 210

cac ctg ggt gaa ttt gga tcc cgc gag aat atc gcg cag gca aaa ggc 5153
 His Leu Gly Glu Phe Gly Ser Arg Glu Asn Ile Ala Gln Ala Lys Gly
 215 220 225

gag atc att gaa gcg ctg ccc tcg aag aaa acg ggt ggg gta gca gtc 5201
 Glu Ile Ile Glu Ala Leu Pro Ser Lys Lys Thr Gly Gly Val Ala Val
 230 235 240

ctt aac gct gac gat cct ttt gtc gcc cgg atg gct cca cgc act aag 5249
 Leu Asn Ala Asp Asp Pro Phe Val Ala Arg Met Ala Pro Arg Thr Lys
 245 250 255 260

gcg cgc gtg gtg tgg ttt acc acc gat gca ggc caa gca aaa aag tct 5297
 Ala Arg Val Val Trp Phe Thr Thr Asp Ala Gly Gln Ala Lys Lys Ser
 265 270 275

gat tat tgg gca acg agt att tca ctg gac gct gtt gcg cgg gca agc 5345
 Asp Tyr Trp Ala Thr Ser Ile Ser Leu Asp Ala Val Ala Arg Ala Ser
 280 285 290

tt 5347

<210> 2

<211> 581

<212> PRT

<213> Brevibacterium lactofermentum

<400> 2

Met Val Thr Arg Ile Ala Leu Val Ile Ala Gly Val Leu Ile Ile Arg
 1 5 10 15

Leu Gly Trp Val Gln Val Val Trp Gly Pro Glu Leu Ser Leu Asn Ala
 20 25 30

Ser Glu Gln Arg Thr Arg Val Tyr Val Asp Pro Ala Arg Arg Gly Thr
 35 40 45

Ile Val Asp Arg Glu Gly Asn Gln Met Ala Tyr Thr Met Gln Ala Arg
 50 55 60

Ser Leu Thr Val Ser Pro Asn Ile Met Arg Glu Glu Leu Lys Thr Gly
 65 70 75 80

Thr Asp Leu Ala Leu Arg Leu Ala Ala Glu Glu Thr Asp Pro Glu Asn
 85 90 95

Val Ala Ser Tyr Val Thr Ile Glu Glu Gly Asn Ala Tyr Val Phe Ala
 100 105 110

Ser Glu Glu Gln Arg Glu Thr Ile Leu Ser Asp Lys Val Glu Glu Arg
 115 120 125
 Ile Gln Ser Ile Ala Asp Arg Ile Pro Glu Ile Ile Lys Ser His Asp
 130 135 140
 Gln Asp Val Thr Gly Ile Ser Ser Glu Glu Ile Leu Asp Lys Leu Asn
 145 150 155 160
 Ala Asp Ser Gln Tyr Glu Val Leu Val Arg Asn Val Asp Pro Asp Val
 165 170 175
 Ala Ser Glu Ile Thr Asp Glu Met Pro Ser Val Ala Ala Asp His Gln
 180 185 190
 Asp Ile Arg Gln Tyr Pro Asn Gly Ala Ile Gly Glu Asn Ile Ile Gly
 195 200 205
 Arg Ile Ser Met Asp Gly Glu Gly Gln Phe Gly Phe Glu Ala Ser Asn
 210 215 220
 Asp Ser Leu Leu Ala Gly Asn Asn Gly Arg Ser Thr Gln Asp Met Ser
 225 230 235 240
 Ile Leu Gly Gln Ala Ile Pro Gly Thr Leu Arg Asp Gln Ile Pro Ala
 245 250 255
 Ile Asp Gly Ala Ser Val Glu Leu Thr Val Asp Leu Asp Leu Gln Thr
 260 265 270
 Tyr Val Gln Gln Ala Leu Glu Gln Ala Lys Ala Asn Ser Gly Ala Glu
 275 280 285
 Asn Ala Ser Ala Val Val Leu Asp Ala Glu Thr Ala Glu Val Leu Ala
 290 295 300
 Met Ala Asn Thr Asp Thr Ile Asn Pro Asn Glu Asp Thr Gly Lys Gln
 305 310 315 320
 Ile Glu Gln Gly Lys Ser Phe Asp Asn Pro Ser Val Thr His Pro Phe
 325 330 335
 Glu Pro Gly Ser Val Ala Lys Val Ile Thr Ala Ala Gly Val Ile Gln
 340 345 350
 Asp Gly Leu Thr Thr Pro Asp Glu Val Leu Gln Val Pro Gly Ser Ile
 355 360 365
 Glu Met Ala Gly Val Ser Val Gly Asp Ala Trp Asp His Gly Val Val
 370 375 380
 Pro Tyr Thr Thr Ala Gly Ile Phe Gly Lys Ser Ser Asn Val Gly Thr
 385 390 395 400
 Leu Met Leu Ala His Gly Leu Gly Glu Asp Lys Phe Ala Asp Tyr Leu
 405 410 415
 Glu Arg Phe Gly Val Gly Gln Ser Thr Gly Ile Glu Leu Pro Ser Glu

Val Ser Phe Val Glu Phe His Asn Leu Asn Phe Cys Leu Asn Ser Phe
1 5 10 15

Arg His His Pro Arg Ala Ala Ser Glu Leu Leu Thr Pro Arg Asn Leu
20 25 30

Trp Arg Arg Glu Asn His Gly Asn His Val Ala Gly Pro His Gln Thr
35 40 45

Tyr Arg Trp His Pro Gln Gly Leu Cys Gln Gly Val Pro Ala His Ala
50 55 60

Val Gly Glu Gln Ala Ile Ala Ala Ile Gly Leu Asp Ser Ser Ser Leu
65 70 75 80

Pro Thr Ser Asp Ala Ile Phe Ala Ala Val Pro Gly Thr Arg Thr His
85 90 95

Gly Ala Gln Phe Ala Gly Thr Asp Asn Ala Ala Lys Ala Val Ala Ile

11/13

100					105					110					
Leu	Thr	Asp	Ala	Ala	Gly	Leu	Glu	Val	Leu	Asn	Glu	Ala	Gly	Glu	Thr
		115					120					125			
Arg	Pro	Ile	Ile	Val	Val	Asp	Asp	Val	Arg	Ala	Val	Leu	Gly	Ala	Ala
	130					135					140				
Ser	Ser	Ser	Ile	Tyr	Gly	Asp	Pro	Ser	Lys	Asp	Phe	Thr	Leu	Ile	Gly
145					150					155					160
Val	Thr	Gly	Thr	Ser	Gly	Lys	Thr	Thr	Thr	Ser	Tyr	Leu	Leu	Glu	Lys
				165					170					175	
Gly	Leu	Met	Glu	Ala	Gly	His	Lys	Val	Gly	Leu	Ile	Gly	Thr	Thr	Gly
		180						185					190		
Thr	Arg	Ile	Asp	Gly	Glu	Glu	Val	Pro	Thr	Lys	Leu	Thr	Thr	Pro	Glu
		195					200					205			
Ala	Pro	Thr	Leu	Gln	Ala	Leu	Phe	Ala	Arg	Met	Arg	Asp	His	Gly	Val
	210					215					220				
Thr	His	Val	Val	Met	Glu	Val	Ser	Ser	His	Ala	Leu	Ser	Leu	Gly	Arg
225					230					235					240
Val	Ala	Gly	Ser	His	Phe	Asp	Val	Ala	Ala	Phe	Thr	Asn	Leu	Ser	Gln
				245					250					255	
Asp	His	Leu	Asp	Phe	His	Pro	Thr	Met	Asp	Asp	Tyr	Phe	Asp	Ala	Lys
		260						265					270		
Ala	Leu	Phe	Phe	Arg	Ala	Asp	Ser	Pro	Leu	Val	Ala	Asp	Lys	Gln	Val
	275						280					285			
Val	Cys	Val	Asp	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Arg	Met	Ala	Ser	Val	Ala	Ala
	290					295					300				
Asp	Val	Gln	Thr	Val	Ser	Thr	Leu	Gly	Gln	Glu	Ala	Asp	Phe	Ser	Ala
305					310					315					320
Thr	Asp	Ile	Asn	Val	Ser	Asp	Ser	Gly	Ala	Gln	Ser	Phe	Lys	Ile	Asn
			325						330					335	
Ala	Pro	Ser	Asn	Gln	Ser	Tyr	Gln	Val	Glu	Leu	Ala	Leu	Pro	Gly	Ala
			340					345					350		
Phe	Asn	Val	Ala	Asn	Ala	Thr	Leu	Ala	Phe	Ala	Ala	Ala	Ala	Pro	Trp
		355					360					365			
Val	Leu	Met	Ala	Thr	Phe	Ala	Arg	Gly	Met	Ser	Lys	Val	Ala	Val	Pro
	370					375					380				
Gly	Arg	Met	Glu	Arg	Ile	Asp	Glu	Gly	Gln	Asp	Phe	Leu	Ala	Val	Val
385					390					395					400
Asp	Tyr	Ala	His	Lys	Pro	Ala	Ala	Val	Ala	Ala	Val	Leu	Asp	Thr	Leu
				405					410					415	

12/13

Arg Thr Gln Ile Asp Gly Arg Leu Gly Ser Gly Tyr Arg Cys Trp Trp
 420 425 430

Arg Arg Asp Ser Thr Lys Arg Gly Pro Met Gly Ser Cys Pro His Arg
 435 440 445

Ser Gly Ser Ser Tyr Cys Thr Asp Ala Asn Leu Val Arg Val Ala Gly
 450 455 460

Thr Ile Arg Ala Ala Val Thr Ala Gly Ala Gln Gln Gly Ala Ser Glu
 465 470 475 480

Ser Glu Arg Pro Val Glu Val Leu Glu Ile Gly Asp Arg Ala Glu Ala
 485 490 495

Ile Arg Val Leu Val Glu Trp Ala Gln Pro Gly Asp Gly Ile Val Val
 500 505 510

Ala Gly Lys Gly His Glu Val Gly Gln Leu Val Ala Gly Val Thr His
 515 520 525

His Phe Asp Asp Arg Glu Glu Gly Arg Ala Ala Leu Thr Glu Lys Leu
 530 535 540

Asn Asn Lys Leu Pro Leu Thr Thr Glu Glu Gly
 545 550 555

<210> 4

<211> 293

<212> PRT

<213> Brevibacterium lactofermentum

<400> 4

Met Ile Thr Met Thr Leu Gly Glu Ile Ala Asp Ile Val Gly Gly Arg
 1 5 10 15

Leu Thr Gly Gly Ala Gln Glu Asp Thr Leu Val Ser Ser Ser Val Glu
 20 25 30

Phe Asp Ser Arg Ser Leu Thr Pro Gly Gly Leu Phe Leu Ala Leu Pro
 35 40 45

Gly Ala Arg Val Asp Gly His Asp Phe Ala Ala Thr Ala Ile Glu Lys
 50 55 60

Gly Ala Val Ala Val Leu Ala Ala Arg Glu Val Asp Val Pro Ala Ile
 65 70 75 80

Val Val Pro Pro Val Lys Ile Gln Glu Ser Asn Ala Asp Ile Tyr Ala
 85 90 95

His Glu Pro Asp Gly His Gly Ala Ala Val Val Glu Ala Leu Ser Arg
 100 105 110

Leu Ala Arg His Val Val Asp Ile Cys Val Ala Gly His Gln Leu Asn
 115 120 125

Val Val Ala Ile Thr Gly Ser Ala Gly Lys Thr Ser Thr Lys Asp Phe
 130 135 140
 Ile Ala Thr Val Leu Gly Gln Asp Gly Pro Thr Val Ala Pro Pro Gly
 145 150 155 160
 Ser Phe Asn Asn Glu Leu Gly Leu Pro His Thr Val Arg Cys Thr Thr
 165 170 175
 Asp Thr Lys Tyr Leu Val Ala Glu Met Ser Ala Arg Gly Ile Gly His
 180 185 190
 Ile Lys His Leu Thr Glu Ile Arg Pro Pro Arg Ile Ala Ala Val Leu
 195 200 205
 Asn Val Gly His Ala His Leu Gly Glu Phe Gly Ser Arg Glu Asn Ile
 210 215 220
 Ala Gln Ala Lys Gly Glu Ile Ile Glu Ala Leu Pro Ser Lys Lys Thr
 225 230 235 240
 Gly Gly Val Ala Val Leu Asn Ala Asp Asp Pro Phe Val Ala Arg Met
 245 250 255
 Ala Pro Arg Thr Lys Ala Arg Val Val Trp Phe Thr Thr Asp Ala Gly
 260 265 270
 Gln Ala Lys Lys Ser Asp Tyr Trp Ala Thr Ser Ile Ser Leu Asp Ala
 275 280 285
 Val Ala Arg Ala Ser
 290

<210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 5
 gcgcgaattc cgcaacctcg tcgtgacatg

30

<210> 6
 <211> 340
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 6
 gcgcgaattc aagaccaata gccgcgattg cttg

34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01084

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.C1⁶ C12P13/14, C12N15/31 // (C12N15/31, C12R1:13)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1⁶ C12P13/14, C12N15/31

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DDBJ/EMBL/GenBank

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Mol. Gen. Genet., Vol. 191, (1983), Nakamura et al., "On the process of cellular division in E. coli" P.1-9	1-9
A	Mol. Microbiol., Vol. 3, (1989), Laible et al., "Nucleotide sequence of the pbpX genes encoding the penicillin-binding proteins 2x from Streptococcus pneumoniae R6 and a cefotaxime-resistant mutant, c506." P.1337-1348	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 May, 1999 (10. 05. 99)Date of mailing of the international search report
18 May, 1999 (18. 05. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/01084

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁶ C12P 13/14, C12N 15/31 // (C12N 15/31, C12R 1:13)

B. 調査を行った分野
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁶ C12P 13/14, C12N 15/31

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
DDBJ/EMBL/GenBank

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Mol. Gen. Genet., Vol. 191, (1983), Nakamura et al., 「On the process of cellular division in E. coli」 P. 1-9	1-9
A	Mol. Microbiol., Vol. 3, (1989), Laible et al., 「Nucleotide sequence of the pbpX genes encoding the penicillin-binding proteins 2x from Streptococcus pneumoniae R6 and a cefotaxime-resistant mutant, c506.」 P. 1337-1348	1-9

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
10.05.99

国際調査報告の発送日
18.05.99

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
新見 浩一

4 N 9 1 6 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3488